

## CORTINAIRES DE LA SECTION *ORELLANI* : PHOTODÉCOMPOSITION ET HYPOTHÈSE DE LA PHOTOTOXICITÉ DE L'ORELLANINE

par C. ANDARY\*, S. RAPIOR\*, A. FRUCHIER\*\* et G. PRIVAT\*

RÉSUMÉ. — Les rayonnements U.V. décomposent très facilement l'orellanine, isolée de *C. orellanus* et *C. speciosissimus*, en une molécule N-désoxydée : l'orelline par perte d'un, puis de deux oxygènes. Cette photodécomposition, suivie par spectrométrie de RMN du  $^1\text{H}$  à haute résolution, entraîne l'apparition de structures intermédiaires à noyau isoxazolinium qui peuvent établir des liaisons covalentes avec de nombreuses protéines de l'organisme et expliquer ainsi la toxicité de l'orellanine.

Néanmoins, cette molécule demeure à un taux élevé (1-3 %) dans les champignons, même après plusieurs dizaines d'années.

SUMMARY. — After U.V. light exposure, orellanin, isolated from *C. orellanus* and *C. speciosissimus*, is decomposed easily into orellin, the N-deoxidized molecule. This photodecomposition studied by high field NMR spectroscopy leads to the appearance of isoxazolinium intermediary structures which probably are able to covalently bind with numerous proteins in the body leading to organ damage. This could explain the orellanin toxicity.

Nevertheless, the rate of this molecule remains elevated into the fungi, even for several ten years.

MOTS CLÉS : *Cortinarius orellanus*, *C. speciosissimus*; orellanine; photodécomposition; phototoxicité.

Les extraits de certains Cortinaires du sous-genre *Leprocybe* Mos. tels que : *Cortinarius orellanus* Fr. et *C. speciosissimus* Kühn. & Romagn., entraînent à la suite d'un laps de temps de deux à dix-sept jours, un empoisonnement qui se manifeste pas une gastroentérite aiguë associée à de nombreuses atteintes viscérales. Chez l'homme, l'atteinte rénale (avec oligurie et urémie) est la plus importante et se termine en général en néphrite tubulo-interstitielle aiguë, souvent mortelle.

Depuis l'isolement de l'orellanine en Pologne, à partir de *C. orellanus* par GRZYMALA (1962), de nombreux auteurs ont essayé d'étudier la ou les toxines

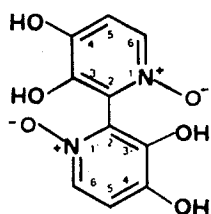
\* Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie - 34060 Montpellier Cedex, France.

\*\* Centre de Chimie Organique, Université des Sciences et Techniques du Languedoc - 34060 Montpellier Cedex, France.

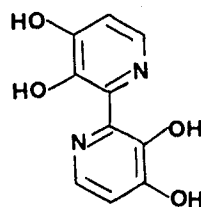
mortelles appartenant à ces Cortinaires (ANTKOWIAK & GESSNER, 1979; KÜRNSTEINER & MOSER, 1981; MOSER & al., 1983; TEBBETT & CADDY, 1984; CADDY, 1984).

Les résultats de ces travaux ne sont pas homogènes et souvent contradictoires. Selon TEBBETT & CADDY (1984), la néphrotoxicité de ces Cortinaires est due à la présence simultanée de deux cyclopeptides : les cortinamines A et B. Ces deux peptides n'existent à la fois que chez *C. orellanus*, *C. speciosissimus* et *C. orellanoides* R. Henry.

Par ailleurs, ANTKOWIAK & GESSNER (1979), poursuivant les travaux de GRZYMALA, ont proposé pour l'orellanine, une structure bipyridine N-oxyde (I) dont les spectres RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ , comparés à ceux donnés dans la littérature pour des molécules plus ou moins proches (CASTELLANO & al., 1967; CASTELLANO & KOSTELNIK, 1968; ANET & YAVARI, 1976; KIRREEV & al., 1977; SOJKA & al., 1979) ne permettaient pas en réalité de choisir avec certitude la formule (I) parmi d'autres isomères possibles (RAPIOR, 1983). Ce n'est que la synthèse de l'orellanine (I) et de l'orelline (II) réalisée très récemment et presque simultanément par DEHMLOW & SCHULZ (1985) et TIECCO & al. (1986) qui confirme la structure indiquée par les chercheurs polonais.



I



II

Nos recherches sur *C. orellanus* et *C. speciosissimus* nous ont conduits à mieux comprendre les problèmes posés par la grande sensibilité à la lumière et la toxicité de l'orellanine. Nous rapportons dans ce travail, l'isolement, la purification et le dosage de l'orellanine à partir de *C. orellanus*. Nous étudions également la photodécomposition de la molécule et nous proposons une nouvelle hypothèse du mécanisme d'action de cette toxine.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les spectres de RMN du  $^1\text{H}$  ont été réalisés à 360 MHz (appareil Bruker WM360 WB). Les déplacements chimiques sont donnés en  $\delta$  (ppm) avec le TMS comme étalon interne. Les spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  seront publiés par ailleurs (travail à paraître).

Les spectres de masse sont effectués à 150°C avec une ionisation de 75 eV et une tension d'accélération de 3 kV (appareil Jeol JMSD 100). Les spectres

U.V. sont réalisés avec des échantillons en solution dans NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N (appareil Unicam SP 1800 UV-VIS). Les points de fusion sont pris sur banc de Koeffler sans correction.

La chromatographie des substances étudiées est effectuée sur couche mince de cellulose prête à l'emploi (Réf. : 5716, Merck) développée dans le mélange : BuOH-HCl-CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O (40 : 20 : 15 : 3,8) (= BCCE). Les différentes molécules sont révélées par exposition des chromatogrammes aux rayonnements U.V. (366 nm).

## 1 - Isolement et purification de l'orellanine

Les échantillons de *C. orellanus* ont été récoltés principalement dans la région de Bédarieux (Hérault) et ceux de *C. speciosissimus* dans le Jura et la Sarthe.

L'extraction est réalisée à partir de 80 g de *C. orellanus* (déshydraté et réduit en poudre fine), par macération à plusieurs reprises, à la température ambiante et à l'abri de la lumière, dans 1500 ml du mélange MeOH-H<sub>2</sub>O (2 : 8). Les solutions extractives sont réunies, filtrées sur papier et concentrées à l'évaporateur rotatif, sous vide et à 30°C jusqu'à obtention d'un volume de 350 ml. Cet extrait est centrifugé à 4000 t/mn pendant 20 mn. Le culot est écarté et le surnageant est délipidé par 5 x 200 ml d'un mélange éther de pétrole - éther (2 : 1).

La fraction aqueuse, débarrassée de toute trace de solvant organique par passage à l'évaporateur rotatif, est concentrée jusqu'à un volume de 100 ml et placée au réfrigérateur. Nous obtenons, au bout de quelques heures un premier lot de cristaux d'orellanine impure. Ces derniers sont séparés par centrifugation à 6000 t/mn pendant 30 mn. Le surnageant est concentré jusqu'à un volume de 30 ml et placé au réfrigérateur en vue d'une seconde cristallisation. Le rendement en orellanine est environ 0,5 % de champignon sec.

La purification de l'orellanine se fait, à l'obscurité, par lavages successifs des cristaux avec de l'eau glacée puis de l'acétone glacée.

**Orellanine** : C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> : di N-oxyde-1,1'-tétrahydroxy-3,3',4,4'-bipyridine-2 : 2'. Cristaux chamois clair, faiblement solubles dans le méthanol, l'acétone, l'eau et les solutions aqueuses d'HCl. Plus solubles dans l'éther monoéthylique de l'éthylène-glycol, le diméthylsulfoxyde, la pyridine et les solutions alcalines. Se colorent en gris violacé avec une solution de chlorure ferrique. P.F. = 230°C avec dégradation. CCM, R<sub>f</sub> = 0,59. U.V. : (NaOH 0,1 N) 235, (292), 319 nm; (NH<sub>4</sub>OH 0,01 N) 223, 286, (316) nm; (HCl 0,1 N) 214, 266, 294 nm. Spectre de M (M<sup>+</sup>. 252; m/e 236, 220). RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm : 7,11 et 8,23 ( 2 x d, J = 6,8 Hz.).

## 2 - Obtention de l'orelline

L'orelline est préparée par exposition aux rayonnements U.V. pendant 1 à 2 h, d'une solution aqueuse d'orellanine. On peut également obtenir l'orelline à partir d'un extrait hydro-méthanolique d'une poudre de *C. orellanus*, centrifugé, délipidé et exposé à la lumière du jour pendant 1 à 2 mois. Les cristaux obtenus sont séparés et lavés à plusieurs reprises par l'eau.

**Orelline** :  $C_{10}H_8O_4N_2$  : tétrahydroxy-3,3',4,4'-bipyridine-2 : 2'. Cristaux chamois très difficilement solubles dans la plupart des solvants. Plus solubles dans les solutions aqueuses acides. Se colorent en gris-bleu avec une solution de chlorure ferrique - P.F.  $> 260^\circ C$  avec brunissement. CCM,  $R_f = 0,42$ . U.V. : (NaOH 0,1 N) 243, (262), 385, 406 nm; (HCl 0,1 N) 215, (250), 304 nm. Spectre de M ( $M^+ 220$ ). RMN<sup>1</sup>H (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm : 6,90 et 7,89 (2 x d, J = 5,4 Hz).

### 3 - Photodécomposition des molécules bipyridines N-oxyde

La décomposition de l'orellanine et de l'orelline est réalisée par exposition des chromatoplaques, soit à la lumière naturelle soit aux rayonnements U.V. (366 nm). L'orellanine utilisée est en solution à 0,2 % dans de l'eau ammoniaquée à 0,02 % et l'orelline en solution à 0,2 % dans HCl 0,1 N.

. **Mode opératoire** : deux chromatoplaques reçoivent 2  $\mu$ l de chacune des deux solutions et sont soumises ensuite pendant 2 h à l'action de la lumière du jour ou des U.V. Ce délai écoulé, on dépose à nouveau 2  $\mu$ l de chacune des deux solutions, en guise de témoins, à côté des dépôts précédents. Les plaques sont aussitôt développées à l'obscurité.

### 4 - Dosage de l'orellanine

. **Extraction** : 150 mg de poudre de champignon sont mis à macérer pendant 10 mn à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation magnétique dans 12 ml du mélange MeOH- $H_2O$  (2 : 8). Cette macération est répétée 4 fois. Après filtration, les solutions sont rassemblées et le volume est ajusté à 50 ml avec le même solvant.

. **Dosage** : l'orellanine est dosée au moyen d'un analyseur chromatographique Farrand UV-VIS 2 (Optical, New York, U.S.A.) à double monochromateurs fonctionnant en fluorescence et par réflexion.  $\lambda$  excitation = 354 nm et  $\lambda$  émission = 450 nm. Le dosage s'effectue par spectrofluorimétrie directe sur les chromatogrammes après avoir déposé 1 à 4  $\mu$ l d'extrait de champignon à côté d'une gamme étalon constituée de 50, 100, 150 et 200 ng d'orellanine préparée à partir d'une solution d'orellanine à 0,005 % dans le mélange MeOH- $H_2O$  (1 : 1). Les chromatoplaques de cellulose sont développées par le BCCE et révélées par exposition aux U.V. (366 nm). La teneur en orellanine est déterminée en se rapportant à la droite d'étalonnage qui représente la variation des surfaces des pics de la gamme étalon en fonction des concentrations.

### 5 - Essais pharmacologiques

L'expérimentation est réalisée avec des souris de sexe mâle, race Swiss, d'un poids moyen de 23-24 g. A la suite d'un jeûne de 18 h, les animaux reçoivent soit une suspension dans l'eau gommeuse des molécules à étudier pour la voie orale, soit une solution à 0,1 % dans l'eau ammoniaquée (pH = 8) pour la voie intra-péritonéale. Ces animaux ne reprennent leur nourriture que 3 h après

l'administration. Différentes doses ont été testées afin d'évaluer la toxicité. Chaque lot d'animaux traités (constitué de 10 souris) est comparé à un lot témoin recevant le même volume d'eau gommeuse ou d'eau ammoniacquée.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

La méthode d'extraction de l'orellanine (I) est inspirée de celle d'ANTKOWIAK & GESSNER (1975). Cette molécule peu soluble cristallise assez facilement en milieu aqueux. Par contre sa purification est délicate à obtenir. Cela s'explique par la dégradation, à la lumière, de l'orellanine en plusieurs produits de photodécomposition. Déjà ANTKOWIAK & GESSNER s'étaient rendus compte, en 1975, de la difficulté d'obtention de l'orellanine pure et parlaient de décomposition thermique qui leur permettait d'obtenir, par sublimation, de l'orelline (II). En 1979 ils établissent la structure de ces deux molécules : l'orelline dérive de l'orellanine par perte des deux oxygènes appartenant aux fonctions N-oxyde.

La méthode de purification de l'orellanine que nous préconisons est simple dans la mesure où nous manipulons à la lumière d'une lampe à incandescence et non à la lumière du jour, ou sous une lampe de type Néon. Il faut éviter toute irradiation par des rayonnements U.V. depuis le début de l'extraction jusqu'à la purification. En effet, séparée de son contexte fongique naturel, l'orellanine sous forme d'extrait brut de champignon, ou de solution pure, se décompose sous l'effet de la lumière pour donner l'orelline. Cette dernière molécule exposée aux rayonnements U.V. (366 nm) présente, immédiatement sur les chromatogrammes, une vive fluorescence bleu clair. Dans ces mêmes conditions l'orellanine, décelée tout d'abord sous forme de tache sombre, donne après 1 à 3 mn d'exposition une fluorescence blanc-bleutée due à sa photodécomposition en orelline.

La sensibilité de cette fluorescence ainsi que sa stabilité nous ont incités à mettre au point une méthode de dosage de la molécule par spectrofluorimétrie directe sur les chromatogrammes. En utilisant des couches minces de cellulose développées par le solvant préconisé (BCCE) la limite de détection est de l'ordre de 10 à 20 ng d'orellanine.

De nombreux dosages réalisés sur des exsiccata de *C. orellanus* ont montré que le taux d'orellanine varie entre 0,5 et 2,5 % de champignon sec. Chez *C. speciosissimus* ces doses sont un peu plus élevées :

Teneur moyenne en orellanine (g/100g champignon sec)	
<i>C. orellanus</i> . . . . .	1,5 - 2
<i>C. speciosissimus</i> . . . . .	2 - 3

Nous avons pu constater que cette molécule est parfaitement conservée dans les exsiccata de champignon où elle est accompagnée de produits de photodécomposition en plus petite quantité, ainsi que d'autres molécules apparentées,

actuellement à l'étude dans notre Laboratoire. Un échantillon de *C. orellanus* âgé de 50 ans (1936) et appartenant à l'herbier de G. MALENÇON, contenait 2,3 % d'orellanine.

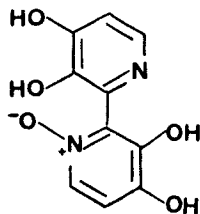
Dans un carpophore sec de poids moyen de 0,8 g, la teneur en orellanine est de 10 mg (avec des doses extrêmes de 5 à 15 mg). Nous avons calculé la teneur en toxine des différents organes chez *C. orellanus* :

Teneur en orellanine (g/100 g champignon sec)	
Chapeau .....	1
Lames .....	1 - 1,5
Stipe .....	0,45

Nous avons également recherché la présence de l'orellanine et de ses produits de décomposition chez les différents Cortinaires appartenant aux diverses sections du sous-genre *Leprocybe* Mos., ainsi que chez ceux du genre *Dermocybe* (Fr.) Wünsche (= sous-genre *Dermocybe* Fr.). L'orellanine ne se trouve que dans les espèces appartenant à la section *Orellani*, c'est-à-dire : *C. orellanus* Fr., *C. speciosissimus* Kühn. & Romagn. (= *C. henrici* Reum., MOSER, comm. pers.), *C. orellanoides* Hry. et *C. rainierensis* Smith & Stuntz (MOSER & al., 1983; KELLER-DILITZ & al., 1985). De tous les représentants des *Leprocybe* seul *C. bolaris* (Pers. : Fr.) Fr. possède des taches de fluorescence blanc bleutée dont les Rf sont très proches de ceux de l'orellanine et de l'orelline. Nous avons vérifié l'identité de ces taches par exposition aux rayonnements U.V., addition de témoins internes d'orellanine et d'orelline et chromatographie bidimensionnelle. Nous avons pu ainsi confirmer l'absence d'orellanine chez cette espèce.

La fig. 1 compare la photodécomposition de l'orellanine, déposée sur une chromatoplaque et exposée soit à la lumière du jour, soit aux rayonnements U.V. Ce traitement fait apparaître l'orelline qui par contre est stable sous l'action de ces mêmes rayonnements. En effet cette molécule est le stade final de la photodécomposition de l'orellanine. De plus, il faut noter sur les chromatogrammes la présence de deux molécules intermédiaires lors de la N-desoxydation de l'orellanine. Ces molécules de Rf = 0,52 et 0,48 semblent apparaître plus facilement sous un rayonnement de lumière du jour de plus faible intensité qu'un rayonnement produit par une lampe à U.V. (366 nm).

Nous avons pu vérifier cette photodécomposition en suivant le devenir de l'orellanine par étude du spectre RMN du  $^1\text{H}$  à haute résolution (360 MHz) réalisé immédiatement après exposition pendant une heure du tube contenant



III

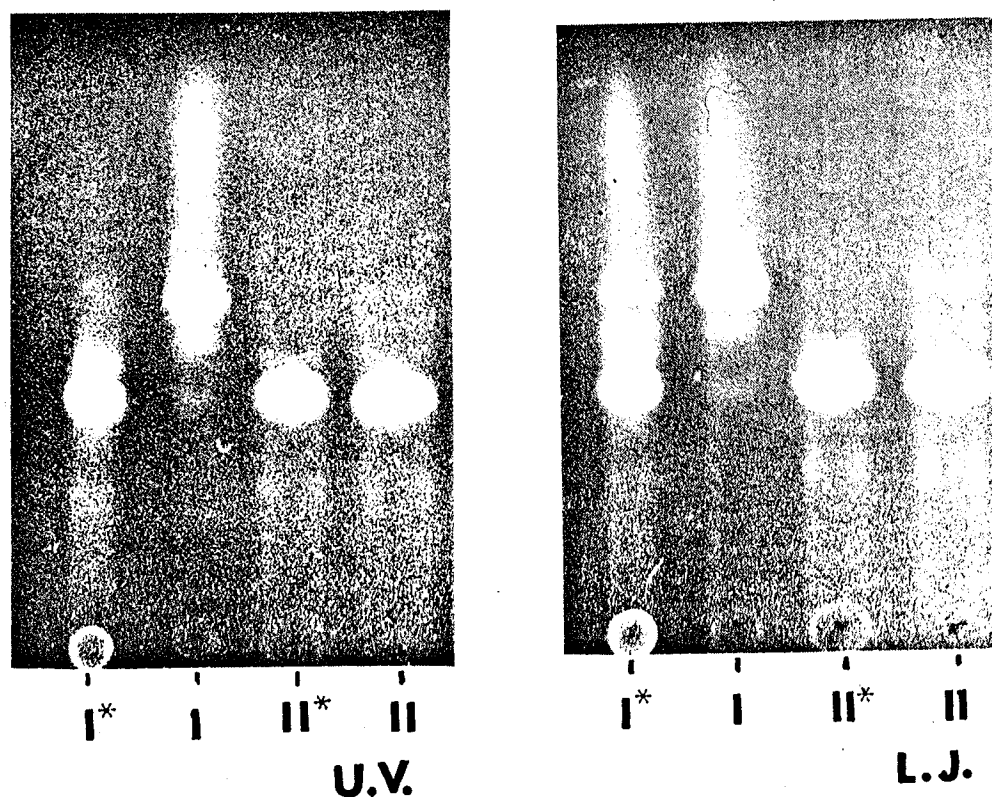


Figure 1 : Chromatographie sur couche mince de cellulose de l'orellanine (I) et de l'orelline (II) après exposition de ces molécules soit aux U.V. à 366 nm (U.V.) soit à la lumière du jour (L.J.).

I\* et II\* : molécules exposées aux rayonnements  
I et II : molécules non exposées (témoins)

Figure 1 : Thin layer chromatography of orellanine (I) and orellin (II) after U.V. at 366 nm (U.V.) or day light (L.J.) exposure.

I\* and II\* : light exposed molecules  
I and II : non exposed molecules

la solution saturée d'orellanine dans le DMSO-d<sub>6</sub>. Ce spectre (fig. 2) comporte les signaux caractéristiques de trois composés correspondant à l'orellanine (I), l'orelline (II) et l'orellinine (III) (ces trois termes sont ceux qu'utilisent ANT-KOWIAK & GESSNER (1985) après les avoir visualisés par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle). Ces signaux nous ont permis d'avoir la structure précise de ces trois molécules et tout particulièrement celle de l'orellinine qui n'avait pas encore été confirmée. Les déplacements chimiques se rapportant à cette dernière molécule (tab. 1) indiquent la présence d'une structure dissymétrique qui, d'après les constantes de couplage observées, n'a plus qu'un groupe N-oxyde : a et d sont attribués aux protons de la moitié pyridine N-oxyde, b et c à ceux de la moitié pyridine. En effet de tels signaux ne s'observent pas avec des molécules symétriques comme l'orellanine ou l'orelline.

Par ailleurs, nous pensons que les différentes molécules de photodécomposition de l'orellanine jouent un rôle essentiel dans l'activité pharmacologique de

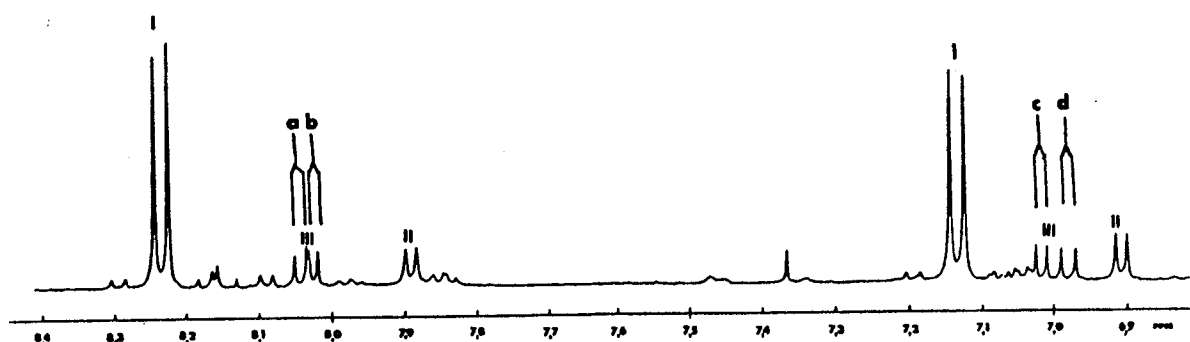


Figure 2 : Spectre de RMN  $^1\text{H}$  (360 MHz) de l'orellanine, en solution saturée dans le  $\text{DMSO-d}_6$ , après exposition de cette solution aux U.V. (366 nm, 1 h).

I : orellanine; II : orelline; III : orellinine.

Figure 2 :  $^1\text{H}$  NMR (360 MHz) spectrum of saturated orellanin solution in  $\text{DMSO-d}_6$ , after U.V. exposure (366 nm, 1 h).

I : orellanin; II : orellin; III : orellinin.

Orellanine (I)	Orellinine (III)	Orelline (II)
	a : 8,037 (d) ( $\underline{J}$ = 7,0 Hz)	
7,134 (d) ( $\underline{J}$ = 6,8 Hz)	b : 8,019 (d) ( $\underline{J}$ = 5,5 Hz)	6,907 (d) ( $\underline{J}$ = 5,4 Hz)
8,233 (d) ( $\underline{J}$ = 6,8 Hz)	c : 7,010 (d) ( $\underline{J}$ = 5,5 Hz)	7,891 (d) ( $\underline{J}$ = 5,4 Hz)
	d : 6,976 (d) ( $\underline{J}$ = 7,0 Hz)	

Tableau 1 : Valeurs des déplacements chimiques (ppm) du spectre RMN $^1\text{H}$  de l'orellanine (I), l'orellinine (III) et de l'orelline (II). d : doublet; J : constante de couplage (Hz).

Table 1 :  $^1\text{H}$  NMR peaks (ppm) of orellanin (I), orellinin (III) and orellin (II). d : doublet; J : coupling constant (Hz).

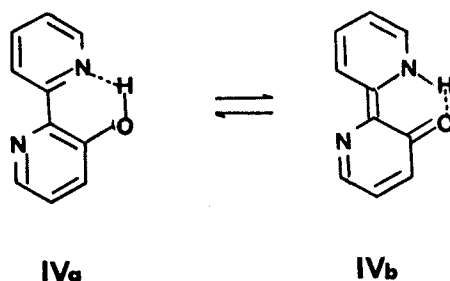
cette dernière. Nous avons testé sur l'animal l'orellanine purifiée (extraite à l'abri de la lumière) aux doses de 4, 6, 8, 12 et 50 mg/kg et *per os*. Aucune de ces doses ne s'est révélée toxique même au bout de deux mois d'observation. Par contre, toujours par voie orale, une dose d'orellanine de 50 mg/kg d'animal (extraite à la lumière du jour et présentant de ce fait des composés de photo-décomposition) entraîne la mort des animaux dès le quatrième jour et pendant le mois qui suit. La  $\text{DL}_{50}$  de cette molécule évaluée par GRZYMALA (1962) est de 8,3 mg/kg chez la souris en injection sous-cutanée. Ainsi, dans nos conditions expérimentales et en utilisant de l'orellanine pure, obtenue à l'abri de la lumière, nous constatons que l'éventuelle toxicité de cette molécule ne peut se manifester qu'au delà de 50 mg/kg. (Nous n'avons pu évaluer la  $\text{DL}_{50}$  car nous ne disposons pas suffisamment de substance parfaitement pure).



Nos résultats expérimentaux rejoignent ceux obtenus par RICHARD & al. (1985) à la suite d'une intéressante étude sur la quantification de la relation structure-activité de diverses pyridines substituées. En effet, selon les calculs utilisés par ces auteurs et qui permettent de prédire le niveau de toxicité d'une molécule, la  $DL_{50}$  théorique de l'orellanine est de 5 g/kg d'animal. Expérimentalement, pour ces mêmes auteurs, à partir d'une orellanine extraite de carpophore de *C. orellanus* (sans indication de méthodologie) la  $DL_{50}$  est de 12,5 mg/kg (chez la souris et par voie intra-péritonéale). Ces auteurs émettent l'hypothèse d'une différence dans le mécanisme d'action de l'orellanine par rapport à celui de la série des dérivés pyridiniques étudiés.

L'orellanine extraite par les différents auteurs (GRZYMALA, 1962; ANTKOWIAK & GESSNER, 1975; RICHARD & al., 1985) peut très facilement, sous l'action des U.V., comporter des traces de produits de photodécomposition qui contribueraient à la toxicité de la molécule. Par ailleurs, en faible quantité, ces produits de décomposition sont difficiles à mettre en évidence sur les spectres RMN et même sur certains chromatogrammes quand le solvant de développement est, par exemple, constitué d'un mélange de butanol, d'acide acétique et d'eau. Dans ce cas, la fluorescence de l'orelline en particulier est atténuée.

Cette molécule est naturellement fluorescente en raison de sa structure hydroxy-3-bipyridine-2 : 2' qui entraîne une phototautomérisation du type céto-énolique IVa  $\rightleftharpoons$  IVb (CONSTABLE & SEDDON, 1983).

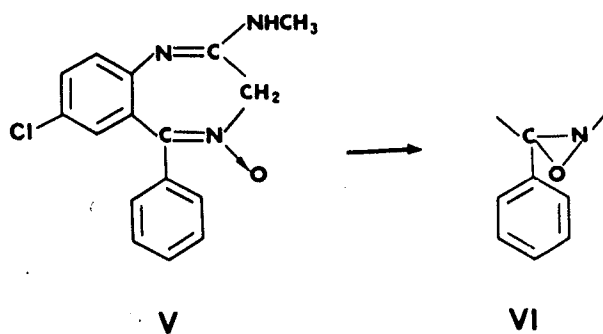


Cette fluorescence, avivée en présence d'acides inorganiques halogénés (ex : HCl), permet de déceler immédiatement l'orelline à l'état de trace sur les chromatogrammes exposés aux U.V. et développés par le solvant que nous préconisons (BCCE).

La désoxydation de l'orellanine qui donne l'orelline, par photodécomposition ou dégradation thermique, est très probablement le phénomène clef qui explique la toxicité de la première molécule et la non toxicité de la seconde. Comme l'ont montré RICHARD & al. (1985), on ne peut prédire la toxicité de l'orellanine en appliquant les équations de quantification de la relation structure-activité qui aboutissent à une  $DL_{50}$  très élevée, donc différente de la  $DL_{50}$  expérimentale. De plus, les amines oxydes et les composés phénoliques correspondent en général à des métabolites de détoxication, s'éliminant assez facilement.

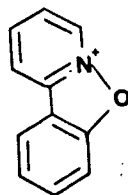
Cette toxicité qui semble inattendue est cependant explicable. Nous connaissons en effet la phototoxicité du chlordiazepoxide V (= Librium<sup>R</sup>) qui a

été parfaitement démontrée par BAKRI & al. (1983) sur le rat. Ces auteurs font intervenir un métabolite intermédiaire entre le produit initial N-oxydé et le produit final désoxydé que l'on retrouve dans les urines. Ce métabolite correspond à un produit de photodécomposition (après irradiation du chlordiazepoxide) de la fonction N-oxyde en fonction époxyde (= oxaziridine, VI).



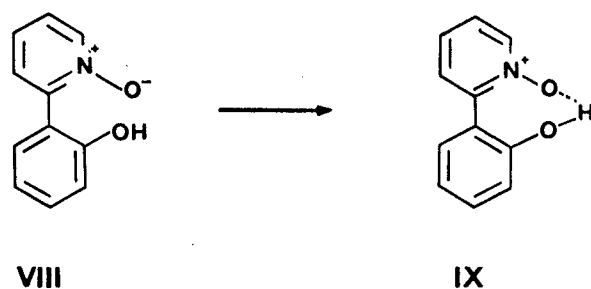
Ce réarrangement photochimique s'observe assez fréquemment avec certaines molécules à fonction N-oxyde (KAWATA & al., 1983) et entraîne la réduction de ces fonctions. Ce pont époxyde est capable d'établir des liaisons covalentes dans l'organisme avec le glutathion et de nombreuses protéines (à fonction -SH par exemple). BAKRI & al. (1983) ont démontré que l'oxaziridine, qui se forme dans la peau à la suite d'une irradiation U.V., provoque non seulement des troubles cutanés (œdèmes, érythèmes...) mais est également capable de traverser les membranes biologiques et de se lier à d'autres organes plus profonds (foie, reins et protéines plasmatiques). Dans le foie par exemple on assiste à une diminution de près de 30 % du poids de cet organe ainsi qu'à la baisse de l'activité enzymatique. Par contre à l'obscurité la molécule à fonction N-oxyde n'entraîne pas ces effets toxiques. De même, le chlordiazepoxide désoxydé n'est pas toxique pour le rat exposé à la lumière.

Par ailleurs, au cours de l'étude de dérivés halogénés du di-N-oxyde bipyridine-2 : 2' par CONSTABLE & SEDDON (1983) et de la synthèse du 2-(hydroxy-2'phényl) pyridine N-oxyde par ANTKOWIAK & GESSNER (1984), il a été mis en évidence l'apparition de produits intermédiaires à noyau isoxazolium, c'est-à-dire avec un pont époxyde (VII) apparaissant au cours de la désoxydation de ces N-oxydes.



VII

ANTKOWIAK & GESSNER (1984) ont montré que le départ d'oxygène se fait par décomposition de l'hydroperoxyde IX formé à partir d'une pyridine N-oxyde hydroxylée en C-2' (VIII). Cette réaction, pour se produire, nécessite un niveau d'énergie relativement bas telle qu'une irradiation U.V. (366 nm) ou une température de 200°C environ.



CONSTABLE & SEDDON (1983) constatent également avec ces structures «bipyridine N-oxyde» que toute substitution électrophile en position C-4 favorise et stabilise la formation d'une cyclisation intramoléculaire du type isoxazolium. C'est précisément le cas de l'orellanine qui est hydroxylée en position 4 et 4'. On peut parfaitement émettre l'hypothèse de l'apparition de dérivés intermédiaires avec un ou deux ponts époxydes pressentis au vu des taches de  $R_f = 0,52$  et  $0,48$  observées sur les chromatogrammes au cours de l'irradiation de l'orellanine.

Des travaux en cours au Laboratoire, réalisés à partir d'animaux soumis à une irradiation U.V. ou conservés à l'obscurité, tendent à démontrer la responsabilité de la photodécomposition des fonctions N-oxydes dans le mécanisme de toxicité de l'orellanine.

Nous avons tout récemment réussi la culture de *C. orellanus* en milieu gélosé et en milieu liquide et avons obtenu, pour la première fois, une souche mycélienne productrice d'orellanine (travail à paraître). Cette souche nous permettra de mettre au point la bioproduction de cette toxine par culture contrôlée.

#### REMERCIEMENTS

Nous adressons tous nos remerciements aux différents mycologues qui ont contribué aux récoltes de *C. orellanus* et *C. speciosissimus* et en particulier à R.C. AZEMA, R. BARTHE, M. BON, G. CHEVASSUT, L. et G. RIOUSSET et J. SALABERT. Nous exprimons toute notre gratitude à Mr L. GRANEL DE SOLIGNAC, Conservateur des Herbiers de l'Institut de Botanique de Montpellier qui nous a permis d'accéder à l'herbier G. MALENÇON. Nous remercions également Mr le Professeur J.J. SERRANO pour avoir réalisé les essais de toxicité sur l'animal. Les spectres de RMN ont été réalisés au Centre de Pharmacologie-Endocrinologie, INSERM-CNRS, Montpellier.

#### BIBLIOGRAPHIE

ANET F.A.L. and YAVARI I., 1976 — Carbon<sup>13</sup> Nuclear Magnetic Resonance study of Pyridine N-oxide. *J. Org. Chem.* 41 : 3589-3591.

- ANTKOWIAK W.Z. and GESSNER W.P., 1975 — Isolation and characteristics of toxic components of *Cortinarius orellanus* Fr. *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Chim.* 23 : 729-733.
- ANTKOWIAK W.Z. and GESSNER W.P., 1979 — The structures of orellanine and orelline. *Tetrahedron Lett.* 21 : 1931-1934.
- ANTKOWIAK W.Z. and GESSNER W.P., 1984 — Synthesis of 2-(2'-hydroxyphenyl) pyridine-N-oxide and its thermal decomposition as a model of orellanine deoxidation. *Tetrahedron Lett.* 25 : 4045-4048.
- ANTKOWIAK W.K. and GESSNER W.P., 1985 — Photodecomposition of orellanine and orellinine, the fungal toxins of *Cortinarius orellanus* and *Cortinarius speciosissimus*. *Experientia* 41 : 769-771.
- BAKRI A., BEIJERSBERGEN van HENEGOUWEN and CHANAL J.L., 1983 — Photopharmacology of the tranquilizer chlordiazepoxide in relation to its phototoxicity. *Photochem. & Photobiol.* 38 : 177-183.
- CADDY B., 1984 — Recent Investigation of Fungal Toxins. *Analyt. Proc. Analyt. Div. Chem. Soc. (London)* 21 : 380-382.
- CASTELLANO S., SUN C. and KOSTELNIK R., 1967 — Analysis of the NMR Spectrum of Pyridine. *J. Chem. Phys. (Lancaster, New York)* 46 : 327-330.
- CASTELLANO S. and KOSTELNIK R., 1968 — The effect of substituents on Proton-Proton Coupling Constants in N-substituted Pyridines and on the *cis* Coupling Constants in the Vinyl group of 2-substituted 1,3-Butadienes. *J. Amer. Chem. Soc.* 90 : 141-147.
- CONSTABLE E.C. and SEDDON K.R., 1983 — A novel rearrangement of 2,2'-bipyridine N, N'-dioxides : the characterisation of dipyrido (1,2-b : 2,3-d) isoxazolinium salts as intermediates in the formation of 3-hydroxy-2,2'-bipyridines. *Tetrahedron* 39 : 291-295.
- DEHMLow E.V. and SCHULZ H.J., 1985 — Synthesis of orellanine, the lethal poison of a toadstool. *Tetrahedron Lett.* 26 : 4903-4906.
- GRZYMALA S., 1962 — L'isolement de l'orellanine, poison de *Cortinarius orellanus* Fries et l'étude de ses effets anatomo-pathologiques. *Bull. Soc. Mycol. France* 78 : 394-404.
- KAWATA H., KIKUCHI K. and KOKUBUN H., 1983 — Studies of the photoreactions of heterocyclic N-dioxides. Identification of the Oxaziridine intermediate of quinoxaline-1,4-dioxide. *J. Photochem.* 21 : 343-350.
- KELLER-DILITZ H., MOSER M. and AMMIRATI J.F., 1985 — Orellanine and other fluorescent compounds in the genus *Cortinarius*, section *Orellani*. *Mycologia* 77 : 667-673.
- KIREEV G.V., LEONT'EV V.B., KURBATOV Y.V., OTROSHCHENKO O.S. and SADYKOV A.S., 1977 — Study of the Carbon <sup>13</sup>NMR Spectra of dipyridyl N-oxides. *Dokl. Akad. Nauk Uzbeksk. SSR* 5 : 55-56.
- KÜRNSTEINER H. and MOSER M., 1981 — Isolation of a lethal toxin from *Cortinarius orellanus*. *Mycopathologia* 74 : 65-72.
- MOSER M., KÜRNSTEINER H., ABERHAM R. e GAMPER R., 1983 — Ricerche sulle proprietà delle tossine presenti nei Cortinari. In : Atti del Convegno Internazionale, Avvelenamento da funghi e da viperidi non ché da altri animali nocivi. Borgo val di taro, Italia (14, 15 Maggio, 1983) : 33-46.
- RAPIOR S., 1983 — Isolement et structure des orellanines chez *Cortinarius orellanus* Fries. D.E.A. Spécialité Chimie Thérapeutique, Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier I, 84 p.
- RICHARD J.M., TAILLANDIER G. and BENOIT-GUYOD J.L., 1985 — A Quantitative Structure - Activity Relationship Study on substituted pyridines as a contribution to the knowledge of the toxic effects of orellanine, a toxin from the mushroom *Cortinarius orellanus*. *Toxicon* 23 : 815-824.
- SOJKA S.A., DINAN F.J. and KOLARCZYK R., 1979 — Carbon <sup>13</sup> Nuclear Magnetic Resonance Spectra of substituted pyridine N-oxides. *J. Org. Chem.* 44 : 307-308.
- TEBBETT I.R. and CADDY B., 1984 — Analysis of *Cortinarius* toxins by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 283 : 417-420.
- TIECCO M., TINGOLI M., TESTAFERRI L., CHIANELLI D. and WENKERT' E., 1986 — Total synthesis of orellanine, the lethal toxin of *Cortinarius orellanus* Fries mushroom. *Tetrahedron* 42 : 1475-1485.